

**KERAGAMAN GENETIK POPULASI *Calophyllum inophyllum* MENGGUNAKAN
PENANDA RAPD (RANDOM AMPLIFICATION POLYMORPHISM DNA)**
*Genetic diversity of Calophyllum inophyllum revealed by RAPD (Random Amplification
Polymorphism DNA)*

I.L.G. Nurtjahjaningsih¹⁾, Titin Haryanti²⁾, A.Y.P.B.C. Widyatmoko¹⁾, Sapto Indrioko²⁾, dan Anto Rimbawanto¹⁾

¹⁾ Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan, Yogyakarta, Indonesia
e-mail: iluh_nc@yahoo.com

²⁾ Fakultas Kehutanan, Universitas Gadjah Mada
Jl. Agro No. 1, Bulaksumur, Sleman, Yogyakarta, Indonesia

Tanggal diterima : 8 Mei 2015, Tanggal direvisi : 25 Mei 2015, Disetujui terbit : 31 Agustus 2015

ABSTRACT

The aims of this study were to assess genetic diversity within populations and genetic relationship among populations of C. inophyllum. Leaf samples as template DNA were collected from 10 natural populations and 1 plantation. Five random amplified polymorphism DNA (RAPD) markers consisted 30 loci were conducted to genetic analysis. Results showed genetic diversity within populations were in low to moderate level (mean $H_E=0.186$). There is no private allele in any populations. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed that genetic differentiation among Islands was insignificant; but the differentiation was significant among populations and individual trees. Genetic distance among populations was in low to moderate level (mean $Da=0.250$). Cluster analysis clearly divided the 11 populations into 2 clusters; cluster I consisted Selayar, Lombok, Gunung Kidul and Padang populations; cluster II consisted Way Kambas, Madura, Ketapang, Dompu, and Yapen populations. The genetic relationships did not associate with their geographical locations. In conclusion, genetic diversity and genetic relationship among populations of C. inophyllum was in moderate level.

Keywords: *genetic diversity, Calophyllum inophyllum, RAPD markers, clusters analysis*

ABSTRAK

Calophyllum inophyllum atau nyamplung tersebar secara alami dan luas di hampir seluruh pantai di Indonesia. Keragaman genetik merupakan pertimbangan penting dalam mendukung keberhasilan strategi pemuliaan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman genetik di dalam populasi dan kedekatan genetik antar populasi nyamplung. Contoh daun digunakan sebagai cetakan DNA; dikumpulkan dari 10 populasi alam dan 1 populasi hutan tanaman. Lima penanda RAPD (*random amplified polymorphism DNA*) yang terdiri dari 30 lokus polimorfik digunakan untuk analisis genetik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa keragaman genetik di dalam populasi nyamplung termasuk dalam nilai rendah sampai sedang (rerata $H_E=0,186$). Alel privat tidak ditemukan pada setiap populasi. Analisis AMOVA (*analysis of molecular variance*) menunjukkan perbedaan genetik antar pulau tidak memberikan nilai yang signifikan terhadap keragaman genetik; nilainya dipengaruhi oleh perbedaan antar populasi dan individu pohon. Jarak genetik antar populasi termasuk dalam nilai yang rendah sampai sedang (rerata $Da=0,250$). Analisis klaster membagi 11 populasi menjadi dua klaster; klaster I terdiri dari populasi Selayar, Lombok, Gunung Kidul dan Padang, klaster II terdiri dari populasi Way Kambas, Madura, Ketapang, Dompu, dan Yapen. Kedekatan genetik antar populasi tidak berhubungan dengan kedekatan posisi geografi. Penelitian ini menyimpulkan bahwa keragaman genetik di dalam populasi dan kedekatan genetik antar populasi nyamplung termasuk dalam nilai sedang. Satuan seleksi dalam strategi pemuliaan harus mempertimbangkan keragaman genetik dalam tingkat populasi atau individu pohon.

Kata kunci: *keragaman genetik, Calophyllum inophyllum, penanda RAPD, analisis klaster*

I. PENDAHULUAN

Callophyllum inophyllum atau nyamplung merupakan salah satu tanaman bernilai ekonomi tinggi untuk bahan bakar nabati (*biofuel*). Kajian tentang pemanfaatan nyamplung dari teknik silvikultur sampai dengan keuntungan ekonomi menyimpulkan bahwa nyamplung layak sebagai bahan bakar alternatif pengganti bahan bakar fosil. Kelayakan bahan bakar berbasis nyamplung ditindak-lanjuti dengan adanya kerjasama antara Kementerian Kehutanan dan Kementerian ESDM untuk menyediakan demplot hutan tanaman industri *biofuel* serta program desa mandiri energi berbasis nyamplung di Kabupaten Kebumen, Purworejo dan Banyuwangi (Kuswanto dkk., tidak dipublikasikan).

Nyamplung tumbuh secara alami di sepanjang pantai di Indonesia; potensi hutan nyamplung tersebar secara luas dari pulau Sumatera sampai dengan Papua dan sudah dibudidayakan masyarakat dalam kurun waktu lama (Anonim, 2008). Nyamplung cenderung memiliki pembungaan yang serempak antar individu (Nurtjahjaningsih dkk., 2012). Penyerbukan pada nyamplung dibantu oleh serangga seperti kumbang, kupu-kupu dan lebah (Nurtjahjaningsih dkk., 2012); penyebaran biji nyamplung secara gravitasi sehingga biji nyamplung banyak ditemukan di bawah tegakan nyamplung (Priyanto, 2013). Biji

nyamplung juga mudah disebarkan oleh gelombang laut. Kelelawar juga dianggap berperan dalam menyebarkan biji nyamplung terutama di dataran tinggi (Mahfudz, komunikasi pribadi).

Pada umumnya, tanaman pantai mempunyai nilai keragaman genetik yang rendah di dalam dan antar populasi (Giang dkk., 2006). Rendahnya keragaman genetik di dalam populasi disebabkan oleh terbatasnya individu yang ada sehingga meningkatkan laju silang dalam dan kawin kerabat (Giang dkk., 2006; Islam dkk., 2004). Biji yang disebarkan oleh gelombang laut, menyebabkan tanaman pantai memiliki sebaran geografis yang luas, hal ini menyebabkan rendahnya keragaman genetik antar populasi (Munthali dkk., 2013). Selain itu, aktifitas manusia dalam budidaya tanaman dengan mencampur daerah asal merupakan penyebab rendahnya keragaman genetik antar populasi (Tsuda dkk., 2009).

Untuk mendukung pembangunan hutan tanaman melalui penyediaan bibit berkualitas dalam kuantitas yang memadai, strategi pemuliaan nyamplung sudah diinisiasi dengan ditetapkannya uji provenan atau ras lahan pada tahun 2010 (Leksono dkk., 2010). Uji provenan bertujuan untuk melihat kemampuan beradaptasi tanaman yang berasal dari berbagai sumber asal benih pada suatu lokasi dimana jenis tersebut akan

dikembangkan; pada dasarnya uji ini bertujuan untuk mengurangi jumlah provenan menjadi sejumlah provenan yang telah teruji sesuai dengan produk yang diinginkan pada tempat tertentu. Uji provenan tersebut melibatkan 6 provenan (seedlot) yaitu Banyuwangi, Gunung Kidul, Purworejo, Cilacap, Ciamis dan Pandeglang. Masing-masing provenan menggunakan 25 tanaman (*tree plot*) dan diulang dalam 6 blok yang dibangun pada 2 lokasi yaitu Kulon Progo dan Ciamis.

Seleksi pohon secara intensif berdasarkan sifat phenotipik/morfologi merupakan salah satu kegiatan utama dalam sebuah strategi pemuliaan, disamping harus tetap mempertahankan keragaman genetik pada tingkat tertentu. Oleh karena itu, pemilihan populasi/provenan yang terlibat dalam pembangunan uji provenan merupakan faktor penting untuk keberhasilan dan ketepatan strategi pemuliaan. Beberapa faktor menyebabkan nilai keragaman genetik di dalam populasi berbeda satu dengan yang lain, diantaranya adalah tipe, habitat dan sifat hutan; sedangkan keragaman genetik antar populasi bergantung pada proses evolusi, adaptasi dan aliran gen. Penyimpangan genetik pada populasi yang berukuran kecil/terdegradasi dapat meningkatkan laju *selfing* (Aldrich dan Hamrick, 1998), mempengaruhi sistem perkawinan dan membatasi sebaran serbuk sari sehingga

mempengaruhi produksi dan kesehatan benih, nilai keragaman genetik dan kelestarian populasi (Allnutt dkk., 1999; Llorens dkk., 2012). Sebaran biji nyamplung oleh gelombang laut menyebabkan tanaman membentuk populasi dengan jumlah individu yang relatif sedikit. Selain itu, konversi hutan nyamplung menjadi lahan pertanian atau perumahan penduduk, pemanfaatan kayu nyamplung menyebabkan hutan terfragmentasi. Dengan mempertimbangkan sifat sebaran alami, adanya indikasi populasi yang terfragmentasi, serta materi genetik untuk pembangunan uji provenan nyamplung yang berasal dari seluruh sebaran alam maupun hutan tanaman, maka mengidentifikasi keragaman genetik populasi nyamplung menggunakan penanda DNA perlu dilakukan untuk menetapkan strategi pemuliaan dengan lebih efisiensi.

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) adalah salah satu penanda DNA menggunakan satu primer yang terdiri dari 10 basa. Penanda ini bersifat dominan sehingga hanya mampu menelusuri alel *homozygote* resesif atau *homozygote* dominan. Penanda ini mudah untuk teramplifikasi dan mampu mendeteksi beberapa lokus polimorfik. Oleh karena itu, penanda RAPD sering digunakan untuk menduga nilai keragaman genetik populasi dan mengidentifikasi suatu jenis. Meskipun bersifat dominan, penanda ini dapat

digunakan untuk menduga laju silang luar pada suatu jenis, misalnya *Eucalyptus urophylla* (Gaiotto dkk., 1997).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui nilai keragaman genetik nyamplung dan kedekatan genetik antar populasi nyamplung. Informasi ini diharapkan dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan dalam menyusun strategi pemuliaan tanaman nyamplung selanjutnya.

II. BAHAN DAN METODE

A. Waktu penelitian

Pengumpulan materi genetik berupa daun dari beberapa populasi dilakukan mulai tahun 2010 sampai dengan 2012, sedangkan analisis keragaman genetik dilakukan pada tahun 2012 di Laboratorium Genetika Molekuler, Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan.

B. Lokasi pengambilan sampel

Sampel daun dikumpulkan dari 10 hutan alam, yaitu Padang (Sumatera Barat), Way Kambas (Lampung), Madura, Lombok Tengah (NTB), Lombok Timur (NTB), Dompu (NTB), Ketapang (Kalimantan Barat), Selayar Gunung (Sulawesi Selatan), Selayar Pantai (Sulawesi Selatan), Yapen (Papua Barat) dan 1 hutan tanaman yaitu Gunung Kidul (DIY) (Gambar 1). Jenis, habitat dan sifat hutan, serta jumlah sampel daun yang digunakan dalam penelitian ini

beragam (Tabel 2). Sebagian besar populasi tersebut terletak di pantai, kecuali Selayar Gunung dan Gunung Kidul, yang terletak di pegunungan/dataran tinggi. Sifat tumbuh tanaman nyamplung pada masing-masing populasi dapat dikategorikan tumbuh mengelompok secara alami sehingga membentuk kumpulan individu dengan jumlah sedikit (3-5 pohon), terfragmentasi atau menyambung (Tabel 2). Sampel daun per individu pohon dimasukkan dalam kantong kertas (amplop). Amplop tersebut dimasukkan dalam kantong plastik yang sudah diisi silika gel. Untuk mempermudah penanganan sampel di laboratorium, satu kantong plastik berisi sampel daun dari populasi yang sama. Sampel-sampel tersebut disimpan di laboratorium pada suhu ruang sampai dilakukan ekstraksi DNA.

C. Analisis DNA menggunakan penanda RAPD

Analisis keragaman genetik dilakukan menggunakan penanda RAPD yang merupakan analisis DNA berdasarkan proses PCR (*polymerase chain reaction*). Proses PCR memerlukan larutan dan kondisi mesin thermal cycler yang sesuai untuk terjadinya penempelan urutan basa primer RAPD pada urutan basa DNA contoh. Larutan PCR terdiri dari 10 μ L yang merupakan campuran dari 10 x *buffer stoffel*, 3 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTP, 0,05Unit *AmpliTaq stoffel polymerase*,

(1989) menyebutkan bahwa umur, ukuran, pertumbuhan dan kondisi tempat tumbuh sangat berpengaruh terhadap reproduksi tanaman. Penyerbukan tidak menjadi faktor pembatas, keberhasilan reproduksi sangat dipengaruhi oleh ukuran tanaman (Crawley, 1997; Norghauer et al., 2015). Ini mencerminkan bahwa seleksi yang dilakukan berdasarkan tinggi pohon mengindikasikan makin tinggi pohon produksi benih yang dihasilkan makin banyak. Secara fisiologis, pohon yang

lebih tinggi akan mendapatkan sinar matahari yang lebih banyak, karena tidak tertutup oleh tajuk pohon yang lain. Kelimpahan sinar matahari ini memberikan pengaruh yang positif bagi pertumbuhan generatif pada tanaman. Jika ditinjau dari umur fisiologisnya, tajuk pohon merupakan bagian tanaman dengan umur fisiologis paling tua. Semakin jauh bagian tanaman dari permukaan tanah, maka umur fisiologisnya semakin matang, sehingga akan memproduksi biji lebih banyak.

Tabel 2. Rata-rata famili diameter, tinggi pohon, jumlah bunga, jumlah buah dan buah terbentuk pada kebun benih kayuputih (pengamatan pada puncak pembungaan 2010)

Famili	Provenan	Diameter (cm)	Tinggi (cm)	Jumlah bunga	Jumlah buah	Buah Terbentuk
1	Rat gelombang, Buru	17,98	9,09	1603	869	0,54
2	Masarete, Buru	14,13	7,51	3267	2081	0,63
3	Rat gelombang, Buru	14,29	7,82	3121	1927	0,61
5	Masarete, Buru	13,00	7,25	2769	1595	0,57
8	Waipirit, Seram	14,23	7,65	1236	494	0,39
9	Pelita Jaya, Seram	16,01	8,12	4109	1898	0,46
10	Pelita Jaya, Seram	13,15	8,90	773	455	0,58
11	Pelita Jaya, Seram	14,95	7,98	2017	1333	0,66
12	Cotonea, Seram	13,59	7,86	3006	1893	0,62
13	Cotonea, Seram	13,15	7,75	2401	1505	0,62
14	Cotonea, Seram	14,93	8,61	1287	720	0,55
18	Suli, Ambon	12,69	6,75	2442	1533	0,62
19	Northern Australia	16,23	7,97	396	120	0,30
20	Northern Australia	14,00	8,07	198	106	0,53
21	Western Australia	11,12	6,52	0	0	0,00
22	Western Australia	15,29	6,58	443	204	0,46
23	Western Australia	14,17	6,74	1881	1197	0,63
24	Gundih, Jawa Tengah	15,49	9,66	6171	4488	0,72
25	Masarete, Buru	16,03	8,21	3102	2162	0,69

Dalam proses fisiologis, ketika tanaman melangsungkan perkembangan vegetatifnya maka perkembangan

generatifnya terhambat, begitu juga sebaliknya. Menurut Levy dan Dean (1998) transisi dari fase vegetatif ke fase generatif

lebih dikendalikan oleh faktor genetis dibandingkan dengan faktor lingkungan. Faktor eksternal seperti cahaya, suhu, iklim dan kadar nutrisi lebih berperan sebagai

stimulator yang memberikan sejumlah sinyal kepada tanaman (Griffin & Sedgley, 1989; Owens et al., 1991; Larcher, 1997)

Tabel.3. Rata-rata famili diameter, tinggi pohon, jumlah bunga, jumlah buah dan buah terbentuk pada kebun benih kayuputih (pengamatan pada puncak pembungaan 2011)

Famili	Provenan	Diameter	Tinggi	Jumlah bunga	Jumlah buah	Buah Terbentuk
1	Rat gelombang, Buru	18,31	9,24	2.020	733	0,36
2	Masarete, Buru	14,52	7,67	2.661	1465	0,55
3	Rat gelombang, Buru	15,07	7,90	1.795	751	0,41
5	Masarete, Buru	13,25	7,35	2.004	797	0,39
8	Waipirit, Seram	15,01	7,71	1.502	601	0,40
9	Pelita Jaya, Seram	16,31	8,25	2.211	871	0,39
10	Pelita Jaya, Seram	13,86	9,12	1.111	395	0,35
11	Pelita Jaya, Seram	15,49	8,05	1.485	563	0,37
12	Cotonea, Seram	14,11	7,95	1.296	607	0,46
13	Cotonea, Seram	13,36	7,95	1.928	874	0,45
14	Cotonea, Seram	15,29	8,89	1.873	863	0,46
18	Suli, Ambon	13,19	6,96	1.282	623	0,48
19	Northern Australia	16,52	8,11	113	25	0,22
20	Northern Australia	14,34	8,28	0	0	0
21	Western Australia	11,40	6,87	0	0	0
22	Western Australia	15,83	6,69	0	0	0
23	Western Australia	14,81	6,87	3.821	2.584	0,67
24	Gundih, Jateng	16,29	9,99	2.025	1.300	0,64
25	Masarete, Buru	16,51	8,43	3.696	2.619	0,70

Secara umum spesies tanaman tropis cenderung untuk melakukan perkembangan pada musim kemarau karena kadar air menjadi faktor pembatas (Larcher, 1997). Namun demikian yang terjadi pada tanaman kayuputih di Gunungkidul adalah sebaliknya. Pengamatan pada kebun benih di Gunungkidul menunjukkan bahwa pembungaan kayuputih dimulai pada peralihan musim kemarau ke musim hujan (November) dan puncak pembungaan

terjadi pada bulan Januari dengan jumlah malai mencapai 16.014 (pengamatan 2010). Ada dugaan perilaku pembungaan ini terkait dengan sifat kayuputih yang toleran terhadap genangan air. Hal yang sama dilaporkan oleh Varghese et al. (2009) pada *Eucalyptus camadulensis* di Panampally, India yang menghasilkan jumlah bunga lebih banyak di musim hujan dibandingkan dengan musim kering.

B. Sinkronisasi pembungaan dan intensitas pembungaan di kebun benih Kayuputih di Paliyan

Sinkronisasi pembungaan di antara pohon-pohon dalam suatu populasi merupakan kunci awal sebuah keberhasilan reproduksi suatu tanaman (Mahoro, 2002; Chen et al., 2011). Hasil pengamatan terhadap sinkronisasi pembungaan kayuputih selama 2 periode pembungaan 2010 dan 2011 pada kebun benih kayuputih Paliyan menunjukkan terdapat persamaan waktu mulai berbunga namun terdapat perbedaan pada masa pembungaan akhir. Pada pengamatan tahun 2010, pembungaan telah dimulai pada pertengahan bulan November 2010 dan berakhir pada Juni akhir (2011). Sementara pada pengamatan kedua (2011) menunjukkan waktu awal berbunga lebih lambat (Desember). Secara umum sebagian besar (70-89%) menunjukkan adanya waktu yang bersamaan dalam memproduksi bunga. Namun demikian masing-masing individu menampakkan waktu mulai berbunga yang berbeda-beda, meskipun berasal dari provenan yang sama. Famili-famili yang berasal dari Australia cenderung menunjukkan keterlambatan dalam berbunga. Hasil pengamatan sinkronisasi pembungaan selama 2 periode dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2.

Selama 2 periode pengamatan pola pembungaan tampak sama. Famili-famili

yang berasal dari provenan yang sama cenderung memiliki waktu pembungaan yang sama, kecuali famili-famili provenan dari Australia bagian barat. Famili 23 yang berasal dari Australia bagian barat menunjukkan proses adaptasi yang berbeda dan memiliki pola pembungaan yang serentak dengan famili dari provenan lain.

Secara umum terdapat sinkronisasi masa pembungaan yang cukup lama pada kebun benih kayuputih. Fenomena ini sangat mendukung untuk terjadinya perkawinan secara acak sehingga peluang untuk mendapatkan benih dari perkawinan silang antar pohon-pohon di kebun benih lebih besar. Sebaliknya, kondisi pembungaan yang tidak sinkron di kebun benih dapat membawa dampak buruk seperti penurunan potensi genetik dan penurunan keragaman genetik (Gomory et al., 2003; Ertekin, 2010)

Meskipun demikian, pada beberapa famili menunjukkan masa pembungaan yang tidak serentak, baik yang lebih awal maupun lebih akhir berbunga. Hal ini dapat menyebabkan peluang terjadinya perkawinan kerabat (*inbreeding*) atau perkawinan sendiri (*selfing*). Seperti yang teramati pada famili 24 pada semua replikasi yang memiliki pembungaan lebih awal (mulai berbunga pada November 2010) mendahului semua famili yang lain. Di sisi lain, kondisi yang demikian juga memungkinkan terjadinya penyerbukan

silang dengan pohon lain di luar kebun benih yang sinkron waktu pembungaannya. Sementara itu pembungaan yang lebih lambat juga teramati misalnya famili-famili 19, 20, 21, dan 22 yang berasal dari Australia. Masa pembungaan yang sangat pendek (misalnya famili 21) dapat menyebabkan terjadinya perkawinan secara tidak acak akibat masa berbunga yang tidak bersamaan, baik karena lebih lambat atau lebih awal. Pohon-pohon yang berbunga lebih awal atau lebih akhir berpotensi diserbuki oleh pohon-pohon lain diluar area kebun benih sehingga memungkinkan terjadinya kontaminasi polen dari luar (Kang & Lindgren, 1998; Kaya et al., 2006).

Dalam dua periode pembungaan famili-famili yang berasal dari Gundih, Jawa Tengah menunjukkan jumlah bunga, buah yang tertinggi, selain itu juga waktu mulai berbunga yang lebih cepat dibandingkan dengan famili-famili lainnya. Famili-famili yang berasal dari kepulauan Ambon, berbunga lebih lambat jika dibandingkan dengan provenan dari Gundih. Famili 23 yang berasal dari Waterbank, Australia bagian barat menunjukkan pola pem-bungaan yang spesifik dibandingkan dengan famili lain dari provenan yang sama. Famili 23 berbunga lebih awal yang hampir serentak dengan famili dari provenan Gundih dan Ambon, dengan jumlah bunga dan buah

yang cukup tinggi di semua replikasi. Sebaliknya famili lain yang berasal dari Australia menunjukkan waktu mulai berbunga paling lambat dan jumlah bunga dan buah yang paling rendah.

C. Indeks overlap

Nilai indeks overlap mencerminkan probabilitas 2 (dua) individu untuk melakukan perkawinan silang. Nilai indeks overlap adalah $0 - 1$. Semakin besar nilai indeks overlap berarti semakin besar peluang terjadinya perkawinan silang di antara 2 individu.

Berdasarkan Tabel 4 terlihat bahwa nilai indeks overlap baik pada tahun 2010 maupun tahun 2011 menunjukkan 95% famili (18 famili) memiliki indeks overlap di atas 0,6. Menurut Gunaga & Vasudeva (2009) nilai indeks overlap di atas 0,6 mencerminkan peluang yang cukup besar untuk famili tersebut dalam melakukan penyerbukan dan pembuahan dengan famili lain sehingga persen keberhasilan menghasilkan biji juga besar. Famili no 21 yang berasal dari Australia bagian barat dalam 2 periode pengamatan menunjukkan nilai indeks overlap yang sangat rendah. Rendahnya nilai ini karena masa pembungaan famili 21 yang sangat pendek serta jumlah bunga yang sangat sedikit. Berdasarkan Tabel 2 dan Tabel 3 juga terlihat bahwa jumlah buah terbentuk